

# میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضد یخ در محلول انجمادی

امراالله روزبهی<sup>۱</sup>، طهمورث شهرپور<sup>۲</sup>، اصغر حیدریان<sup>۳</sup>، سحر الماسی ترک<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، <sup>۲</sup> دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، <sup>۳</sup> دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، کمیته تحقیقات دانشجویی، <sup>۴</sup> دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۱۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** از موارد نیاز به ذخیره سازی انجمادی می‌توان به نگهداری جنین‌ها، جلوگیری از چند قلوزایی و کسب نتایج موفق‌تر بعد از برگشت فیزیولوژی رحم به سیکل طبیعی اشاره کرد. هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضد یخ در محلول انجمادی بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی تخمک‌های منجمد شده موش‌های نژاد C57Bl/6 با محلول‌های ۷/۵، ۱۰ و ۱۲ درصد محلول انجماد شیشه‌ای بارور شده و میزان تکامل آنها تا جنین دو سلولی ثبت شد. پس از انجماد شیشه‌ای جنین‌ها، آنها را تا بلاستوسیست کشت داده و میزان تکامل در هر مرحله ثبت شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و ال‌اس‌دی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** در گروه‌های تخمک‌های منجمد شده با محلول ۱۲/۵ و ۱۵ درصد نتایج با یکدیگر و با گروه کنترل مشابه بود. در جنین‌های منجمد شده با محلول ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ درصد نتایج با هم و با گروه کنترل مشابه بود. نتایج حاصل از انجماد با محلول ۷/۵ درصد در همه گروه‌ها، نتایج ضعیفی بود.

**نتیجه‌گیری:** انجماد شیشه‌ای تخمک و جنین با استفاده از کرایوتاپ، کاهش غلظت ضد یخ را تا محلول‌های ۱۰ و ۱۲/۵ درصد به جای محلول ۱۵، امکان‌پذیر می‌کند و می‌تواند گامی در جهت بهینه کردن پروتکل متداول به شمار آید.

**واژه‌های کلیدی:** انجماد، تخمک، جنین، شیشه‌ای، کرایوتاپ

نویسنده مسئول: دکتر سحر الماسی ترک، بوشهر، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

Email: s.almasi@bpums.ac.ir

## مقدمه

در درمان‌های ناباروري، با گامت‌های گرفته شده از زوجين، جنين‌های متعددي توليد می‌شود که جهت جلوگيري از احتمال چند قلوزايی نبايد همه جنين‌ها را به رحم مادر انتقال داد. بدین ترتيب از نيترورژن مایع برای ذخيره سازی انجمادی<sup>(۱)</sup> جنين‌های مازاد استفاده می‌شود<sup>(۱)</sup>. جلوگيري از هم‌زمان شدن لانه‌گزینی جنين تازه<sup>(۲)</sup> با احتمال وقوع سندرم تحريك بیش از حد تخمدان<sup>(۳)</sup> که احتمال به خطر انداختن پروسه لانه‌گزینی را در بر دارد، از فوايد استراتژی ذخيره‌سازی جنين به منظور انتقال در زمان مناسب‌تر می‌باشد<sup>(۲)</sup>. ذخيره‌سازی انجمادی گامت ماده به جای جنين می‌تواند راه حل مناسبی برای محدودیت‌های اخلاقی باشد. با این روش، مشکل عقيمی که پس از شیمی درمانی و اشعه درمانی در بیماران سرطانی به وجود می‌آید قابل اجتناب است، اضافه بر این که در زنانی که دچار مشکلات ارگان‌های توليد مثلی هستند که به نوعی در عملکرد تخمدان‌ها تأثیر منفي دارند با کارکرد مؤثر این تکنیک می‌توانند از حفظ توان باروري خود مطمئن باشند. هم‌چنین ذخيره‌سازی انجمادی گامت ماده می‌تواند بخشی از برنامه اهداء تخمک و تأسیس بانک تخمک در آینده باشد<sup>(۳)</sup>.

تعريف فیزیکی انجماد شیشه‌ای، جامد شدن سریع یک محلول از حالت مایع به حالت شیشه‌ای با افزایش ویسکوزیته در حین کاهش دما است<sup>(۴)</sup>. در این روش کریستال یخ تشکیل نمی‌شود و از خطر شکست پرده شفاف و بلاستومر جلوگيري می‌شود، اما

سلول‌ها در معرض غلظت زیاد ضدیخ‌ها قرار می‌گیرند<sup>(۵)</sup>. محققان این رشته علمی بر این باورند که در انجماد شیشه‌ای الزاماً نیاز به به کار بردن غلظت زیاد ضد یخ نیست، چرا که اگر سرعت سرد کردن به اندازه کافی زیاد باشد حتی آب خالص را هم می‌توان منجمد شیشه‌ای کرد و به همین ترتیب با استفاده از غلظت زیاد ضد یخ، انجماد شیشه‌ای با سرعت متوسط یا حتی سرعت آهسته دست یافتنی است<sup>(۶ و ۷)</sup>.

به کار گیری توأمان چند ضد یخ از تأثیر سمی مخصوص به یک ضد یخ خاص می‌کاهد. مخلوط ضدیخی که بیشتر متداول است حاوی اتیلن گلیکول<sup>(۴)</sup>، دی متیل سولفوکساید<sup>(۵)</sup> و سوکروز است<sup>(۸)</sup>. باید علاوه بر انتخاب صحیح نوع ضدیخ، غلظت کمتر آنها را به کار برد، اما در عین حال به انجماد شیشه‌ای دست یافت<sup>(۷)</sup>. فاکتور مورد مطالعه بعدی تأثیر سرعت سرد کردن است که با افزایش زیاد سرعت سرد کردن می‌توان از میزان غلظت ضدیخ کاست و سلول‌ها را در معرض سمیت کمتر ضدیخ‌ها یا شرایط غیر سمی قرار داد<sup>(۷)</sup>.

کاستن از حجم محلول انجماد شیشه‌ای، نه تنها باعث افزایش سرعت سرد کردن و یا گرم کردن می‌شود، بلکه شانس تشکیل کریستال‌های یخ را در

1-Cryopreservation

2-Fresh Embryo

3-Ovarian Hyperstimulation Syndrom

4-Ethylene Glycol (EG)

5-Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

## روش بررسی

این مطالعه تجربی پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بوشهر بر روی موش نژاد C57Bl/6 انجام شد. موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه مساوی شامل؛ ۵ گروه آزمون و یک گروه کنترل تقسیم شدند. تخمک‌ها و جنین‌های گروه‌های آزمون ۵-۱ به ترتیب با محلول‌های تعادلی و انجمادی ۰/۵، ۶/۲۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۲/۵ درصد و ۳/۷۵ و ۷/۵ درصد منجمد و سپس گرم شدند. پس از گرم کردن، تخمک‌ها بارور شدند و تا مرحله دو سلولی کشت داده شدند. جنین‌های چهار سلولی نیز پس از گرم شدن، مراحل بعدی تکامل را تا بلاستوسیست طی کرده و ثبت شدند. نمونه‌های گروه کنترل نیز بدون انجماد شیشه‌ای مراحل مختلف را همانند گروه‌های آزمون طی کردند. هر آزمایش حد اقل ۷ بار تکرار شد.

کیست انجماد شیشه‌ای شامل؛ محیط پایه HEPES-buffered TCM 199، محلول تعادلی و محلول انجمادی بود که هر دو از محیط پایه غنی شده با سرم تشکیل شده و حاوی ضد یخ‌های اتیلن گلیکول و دی‌متیل سولفوکساید می‌باشند. محلول‌های تعادلی و انجمادی به ترتیب فاقد و دارای قند سوکرز بودند. محلول‌های گرم کردن، رقیق کردن و شستشو محیط‌های پایه غنی شده با سرم بودند و غلظت‌های مختلفی از سوکرز داشتند. محیط برای دست‌کاری‌های تخمک و جنین بر اساس پروتکل ارگلو و همکاران<sup>(۱)</sup>

سلول‌ها کاهش می‌دهد و هر چه سرعت سرد کردن بیشتر باشد از غلظت محلول انجمادی می‌تواند کاسته شود (۹). به منظور کم کردن حجم محلول انجمادی هنگام انجماد، استفاده از ظروف انجمادی مختلفی برای انجماد شیشه‌ای پیشنهاد شده است. جدیدترین ظرف انجمادی، کرایوتاپ می‌باشد که در ابداع آن به کاهش حجم محلول انجمادی توجه شده است (۵). در صورت استفاده از این وسیله، سرعت سرد کردن به ۲۳۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد، در نتیجه از صدمات ناشی از سرما جلوگیری می‌شود. علاوه بر آن با کاهش حجم محلول با این وسیله، سرعت گرم کردن مجدد نیز به ۴۲۰۰۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش می‌یابد و در نتیجه از تشکیل کریستال‌های یخ حین گرم کردن جلوگیری می‌شود (۵). تکنیک‌های انجماد متنوعی برای انجام موفق‌تر انجماد تخمک پیشنهاد شده است، اما علی‌رغم تلاش فراوان، پیشرفت‌ها در این زمینه کند است (۱۰). برای حصول به بیشترین احتمال موفقیت در تکنیک‌های کمک باروری استفاده از با کیفیت‌ترین گامت اصل اساسی به شمار می‌رود (۱۱). پروتکل‌های مختلف کمک باروری با محاسبه میزان حفظ کیفیت گامت و جنین‌های منجمد شده ارزشیابی می‌شوند (۱۲). هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضد یخ در محلول انجمادی بود.

1-Eroglu et al

محيط هايپر مديوم تهيه و به كار گرفته شد (۱۳). قبل از شروع كار، از محيط كشت انكوبه شده درون انكوباتور با اتمسفر مرطوب داراي ۶ درصد دي اكسيد كربن و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده شد.

موش های ماده ۸-۱۰ هفته ای، نژاد C57Bl/6 که از انستیتو پاستور تهيه شده بودند به روشی که قبلاً منتشر شده است تحريك تخمک گذاری شدند (۱۴). برای گرفتن تخمک متافاز II مدت ۱۴-۱۳ ساعت و برای گرفتن جنين چهار سلولی ۵۶-۵۷ ساعت پس از تزریق هورمون گونادوتروپين انسانی، به ترتيب از پاره کردن ناحیه آمپول لوله رحمی و تکنیک فلاشینگ استفاده شد. برای جداسازی سلول های کومولوس از تخمک از محلول ۰/۱ درصد هیالورونیداز به مدت ۳-۴ دقیقه استفاده شد.

تکنیک انجماد شیشه ای برای تخمک و جنين به یک روش و بر اساس آنچه که قبلاً منتشر شده بود انجام شد (۱۵). در هربار تکرار آزمایش، تعداد نمونه ها از ۳ یا ۴ موش جمع آوری می شد و پس از مخلوط کردن نمونه های تمام موش ها، تخمک هایی که ظاهر و اندازه طبیعی و داراي یک جسم قطبی مشخص بودند، برای انجماد انتخاب شدند. در مورد جنين ها نیز، جنين هایی که ظاهر طبیعی و چهار بلاستومر هم اندازه و سالم داشتند برای انجماد انتخاب شدند. روی هر کرایوتا پ ۵۶ نمونه قرار داده می شد. مدت زمان قرار گیری نمونه ها در محلول تعادلی به ترتيب برای تخمک ها و جنين ها ۷-۸ و ۵ دقیقه در نظر گرفته شد، تا اندازه و شکل طبیعی نمونه ها بازگردانده شود.

ذخیره سازی انجمادی از نیتروژن مایع و به مدت ۵ روز استفاده شد. بعد از گرم کردن، نمونه هایی که به مرفولوژی طبیعی بازگشتند، به عنوان نمونه های زنده در نظر گرفته شده و به محيط كشت منتقل و انكوبه شدند.

برای باروری تخمک ها از اسپرم موش های نر ۱۲-۱۴ هفته ای از نژاد C57Bl/6J و به روشی که قبلاً منتشر شده است، استفاده شد (۱۶). برای لقاح تخمک با کمی تغییر از روش بالابان و همکاران<sup>(۱)</sup> (۲۰۰۳) و بعد از ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون استفاده شد (۱۷ و ۱۸). در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در محلی دور از جسم قطبی، حدود ۱۵-۱۰ درصد از پرده شفاف تخمک های منجمد شده که داراي سيتوپلاسم شفاف، غشای سلولی و پرده شفاف یکپارچه، فضای اطراف زرده ای طبیعی و جسم قطبی دوم بودند به وسیله نیدل بریده می شد. اسپرمی با مرفولوژی و تحرک طبیعی را انتخاب کرده و پس از جدا کردن سر، به داخل تخمک تزریق شد. بعد از چهار بار شستشو در محيط هايپرمدیوم ۴ درصد غنی شده با آلبومين سرم گاوی، در ديش های ۶۰ میلی متری و در قطره های ۲۰ میکرولیتری و تحت روغن مینرال تخمک های بارور شده کشت داده می شدند. مدت ۶ ساعت بعد از تزریق، تخمک هایی را که داراي دو جسم قطبی بودند، بارور شده فرض کرده و تخمک های دژنره حذف شدند. مدت ۲۴ ساعت بعد از تزریق تعداد جنين های دو

1-Balaban et al

سلولی با ظاهر طبیعی و بلاستومرهای هم اندازه و سالم محاسبه و ثبت شدند.

جنین‌های منجمد شده که دارای بلاستومرهای طبیعی و پرده شفاف یکپارچه بودند قطرهای ۲۰ میکرولیتری از محیط هایپر مدیوم ۴ درصد غنی شده با آلبومین سرم گاوی، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۶ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده می‌شدند. روند تکامل جنین‌ها با میکروسکوپ معکوس هر ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت پس از کشت دادن ثبت کرده و در تخمین میزان تکوین بعدی شرکت داده شدند.

درصد تخمک‌های زنده مانده، درصد تشکیل جنین و تکامل آن تا مرحله دو سلولی پس از انجماد شیشه‌ای و درصد تکامل جنین‌های منجمد شده تا مرحله بلاستوسیست در گروه‌های مختلف در هر بار تکرار به دست آمد، سپس میانگین درصدهای فوق در هر آزمایش با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه<sup>(۱)</sup> و ال‌اس‌دی<sup>(۲)</sup> تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

در مقایسه میزان بقای تخمک‌های گروه آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری دیده نشد ( $p>0.05$ )، گرچه نتایج این گروه در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمون بالاتر بود ( $p<0.001$ ). مقایسه نتایج در گروه‌های آزمون ۳، ۴ و ۵ نشان داد که به تناسب کاهش غلظت ضدیخ‌ها میزان بقای تخمک‌ها کاهش معنی‌داری دارد ( $p<0.001$ ). در مورد میزان باروری

نتایج گروه‌های کنترل، آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری نداشتند ( $p<0.05$ )، اما میزان باروری گروه‌های آزمون ۱ و ۲ کمتر از نتایج گروه کنترل بود. این نتایج در مورد گروه آزمون ۳ به طرز چشمگیری کمتر از نتایج گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ بود ( $p<0.001$ ). هیچ کدام از تخمک‌های گروه ۴ بارور نشدند. مقایسه نتایج میزان تکامل تا دو سلولی نشان داد که بین گروه‌های کنترل، آزمون ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $p>0.05$ )، اما نتایج گروه آزمون ۳ کمتر از گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ بود ( $p<0.001$ ) (جدول ۱).

مقایسه نتایج میزان بقای جنین‌های چهار سلولی گروه آزمون ۱ نشان داد که بین نتایج این گروه و گروه‌های آزمون ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $p>0.05$ )، در حالی که نتایج این گروه از نتایج گروه‌های ۴ و ۵ بالاتر بود ( $p<0.001$ ). جنین‌های گروه آزمون ۴ در مقایسه با گروه‌های ۱، ۲ و ۳ میزان بقای کمتری داشتند ( $p<0.001$ ). اختلاف معنی‌داری میان میزان بقای گروه آزمون ۵ با دیگر گروه‌های آزمون وجود داشت ( $p<0.001$ ). نتایج میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله ۸ سلولی در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ( $p>0.05$ )، اگر چه میزان تکامل در گروه‌های آزمون ۱ و ۲ پایین‌تر از میزان تکامل گروه کنترل بود. نتایج در گروه آزمون ۳ به صورت معنی‌داری کمتر از

1-One Way ANOVA

2- Least significance difference (LSD)

گروه كنترل و آزمون ۱ و ۲ بود ( $p < 0.05$ ). همين موضوع در مورد نتايج گروه آزمون ۴ نيز صادق بود، اما هيچ كدام از جنين هاي گروه آزمائشي ۵ به مرحله ۸ سلولي تكامل نيافتند. مقايسه نتايج ميزان تكامل جنين ها تا مرحله مورو لا نشان داد كه اين نتايج در گروه هاي آزمون ۱، ۲ و ۳ كمتر از گروه كنترل بود هر چند كه اختلاف معني داري مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). اين نتايج در مورد گروه آزمون ۴ به صورت معني داري كمتر از گروه كنترل و آزمون ۱ بود ( $p < 0.05$ )، ولي اختلاف معني داري با نتايج گروه هاي آزمون ۲ و ۳ نداشت ( $p < 0.05$ ). مقايسه نتايج ميزان تكامل جنين ها تا مرحله بلاستوسيست

جوان نشان داد كه نتايج تمام گروه هاي آزمون كمتر از گروه كنترل بود، هر چند كه اين اختلاف بين گروه هاي كنترل و آزمون ۱ و ۲ معني دار نبود ( $p < 0.05$ ). همين نتايج در گروه هاي آزمون ۳ و ۴ به صورت معني داري كمتر از گروه هاي كنترل، آزمون ۱ و ۲ بود ( $p < 0.001$ ). نتايج ميزان تكامل جنين ها تا مرحله بلاستوسيست هچ شده در همه گروه ها كمتر از گروه كنترل بود، اما اختلاف بين گروه هاي كنترل و آزمون ۱، ۲ و ۳ معني دار نبود ( $p > 0.05$ ). نتايج تكامل جنين ها تا مرحله بلاستوسيست هچ شده در گروه آزمون ۴ به صورت معني داري كمتر از گروه كنترل و گروه هاي آزمون ديگر بود (جدول ۲).

جدول ۱: مقايسه ميزان بقاء، باروري و تكامل تخمك هاي متافاز II بعد از انجماد شيشه اي با غلظت هاي متفاوت ضد يخ ها در گروه هاي مورد

مطالعه

متغير گروه	تعداد كل تخمك هاي منجمد شده	تعداد كل تخمك هاي باز يافت شده	تعداد تخمك هاي زنده مانده	تعداد تخمك هاي در معرض اسپرم واقع شده	تعداد تخمك هاي بارور شده	تعداد جنين هاي تكامل يافته تا دو سلولي
كنترل	—*	—	—	۱۲۸	۱۲۲	۱۱۵
آزمون ۱	۱۰۶	۱۰۳	۹۷	۹۷	۸۴	۷۶
آزمون ۲	۱۴۵	۱۴۱	۱۲۷	۱۲۷	۱۱۰	۹۷
آزمون ۳	۱۴۰	۱۳۷	۹۸	۹۸	۳۷	۲۱
آزمون ۴	۱۵۷	۱۵۱	۲۳	۲۳	۰	۰
آزمون ۵	۱۸۷	۱۸۶	۰	۰	۰	۰

\* نمونه هاي گروه كنترل منجمد نشده اند.

جدول ۲: مقايسه ميزان تكامل جنين چهار سلولي بعد از انجماد شيشه اي با غلظت هاي متفاوت ضد يخ ها در گروه هاي مورد مطالعه

متغير گروه	تعداد كل جنين هاي منجمد شده	تعداد كل جنين هاي باز يافت شده	تعداد جنين هاي زنده مانده	تعداد جنين هاي كشت شده	تعداد جنين هاي تكامل يافته تا ۸ سلولي	تعداد جنين هاي تكامل يافته تا مورو لا	تعداد جنين هاي تكامل يافته تا بلاستوسيست جوان	تعداد جنين هاي تكامل يافته تا بلاستوسيست هيپك/هچ شده
كنترل	—*	—	—	۱۴۱	۱۲۵	۱۲۸	۱۲۶	۱۱۳
آزمون ۱	۱۴۲	۱۴۱	۱۳۴	۱۳۴	۱۲۵	۱۱۸	۱۱۵	۹۵
آزمون ۲	۱۴۷	۱۴۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۲۵	۱۱۶	۱۱۲	۹۱
آزمون ۳	۱۵۰	۱۴۸	۱۳۶	۱۳۶	۱۱۷	۱۰۸	۹۱	۷۴
آزمون ۴	۲۴۲	۲۳۹	۱۲۴	۱۲۴	۸۵	۷۴	۳۱	۱۰
آزمون ۵	۳۳۸	۳۳۳	۵۰	۵۰	۰	۰	۰	۰

\* نمونه هاي گروه كنترل منجمد نشده اند.

## بحث

مطالعه‌های بسیاری بر روی انجماد شیشه‌ای تخمک و جنین موش سوری انجام شد، اما اکثر آنها از محلول انجمادی با غلظت ۱۵ درصد ضدیخ در پروتکل خود استفاده کرده‌اند (۴-۱). هدف این مطالعه ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل تخمک و جنین پس از انجماد شیشه‌ای با استفاده از کرایوتاپ و غلظت‌های اندک ضدیخ در محلول انجمادی بود.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان بقاء و تکامل تا مورولا و بلاستوسیسست‌های هج شده بین گروه آزمون ۳ جنین‌ها و گروه‌های کنترل و آزمون ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری دیده نشد. برخلاف تکامل طبیعی جنین‌ها تا ۸ سلولی که شاخصی برای تکامل طبیعی بعد از گرم کردن است، نتایج تکامل تا مرحله بلاستوسیسست که نمایانگر آمادگی جنین برای ایجاد توده سلول داخلی است ضعیف بود. علت این موضوع ممکن است به غلظت کم ضدیخ و قابلیت اندک نفوذ آن به درون اندامک‌های حیاتی سلول مثل میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی و دوک میتوزی و حفاظت از آنها مربوط باشد که در مراحل پیشرفته‌تر تکاملی آشکار شده است (۲۱-۱۹).

تشکیل یخ داخل سلولی تحت تأثیر غلظت ضدیخ محلول انجمادی و سرعت انجماد و گرم کردن قرار می‌گیرد (۲۲). با ذکر اهمیت سرعت کاهش دما، به غلظت ضدیخ هم می‌توان اشاره کرد. در این مقوله به این جمله بسنده می‌شود که وقتی سرعت سرد کردن از میزان اپتیموم کمتر باشد به دلیل در معرض بودن

طولانی مدت با شرایط هایپر تونیک، سلول می‌میرد و بالعکس اگر سرعت سرد کردن از میزان اپتیموم بیشتر باشد به دلیل تشکیل یخ داخل سلولی که بی‌شک کشنده است، سلول از بین می‌رود. میزان سرعت اپتیموم به مواردی از جمله؛ حجم سلول و سطح ناحیه، نفوذپذیری به آب و انرژی فعالیت آریئوس بستگی دارد. انرژی وابسته به دما است که برای سرعت واکنش‌های شیمیایی لازم است. دستیابی به میزان اپتیموم سرعت کاهش دما برای تخمک به دلیل کم بودن نسبت سطح به حجم سلول و برای جنین به دلیل وسیع بودن ناحیه سطح و نفوذپذیری کم به آب مشکل است و این موضوع در بسیاری از آزمایش‌ها و تحقیقات مورد بحث می‌باشد (۲۳). مورد آخر اشاره‌ای است به این که با این نوع ترکیب ضدیخ‌ها و غلظت به کار رفته در گروه‌های آزمون ۴ و ۵، باید به آینده علم کرایوبیولوژی چشم داشت تا شاید ظرف انجمادی ابداع شود و سرعت اپتیموم سرد کردن - گرم کردن را بتوان افزون بر آنچه مبدعان کرایوتاپ ذکر می‌کنند، بالا برد.

بدون در نظر گرفتن تفاوت غلظت محلول تعادلی در گروه‌های آزمون تخمک ۴ و ۵، ارزیابی میزان بقاء، باروری و تکامل آنها احتمال برگشت تخمک‌ها به شرایط فیزیولوژیک و عملکرد طبیعی آنها را تأیید نمی‌کنند. گرچه هنوز علت دقیق آسیب‌های ناشی از ذخیره‌سازی انجمادی مشخص نشده است (۱۴)، ولی یافته‌های حاصل از مطالعات گوناگون، خصوصیات منحصر به فرد غشاء سلول تخمک،

وجود گرانول‌های قشری، تشکیلات دوک تخمک در مرحله متافاز و سخت شدن پرده شفاف و بارور شدن تخمک با اسپرم در زمان معین را مانعی در دستیابی به موفقیت کامل ذخیره‌سازی انجمادی تخمک می‌دانند (۲۴-۲۷ و ۱۴). در این پژوهش، در تحلیل یافته‌های ضعیف‌تر بخش مطالعه بر روی تخمک در مقایسه با نتایج مطالعه بر روی جنین می‌توان به این نظریات علمی که بر گرفته از تحقیقات بی شمار است استناد کرد. به عنوان مثال برای توضیح بیشتر می‌توان به این نکته اشاره کرد که بعد از بارور شدن تخمک، هر چه تکامل جنین پیشرفت می‌کند، حجم بلاستومرها کمتر می‌شود، ولی ناحیه سطح افزایش می‌یابد. در مقایسه با تخمک این موضوع سبب نفوذ بیشتر ضدیخ در جنین می‌شود که از شانس تشکیل یخ داخل سلولی کم می‌کند. افزایش میزان بقاء پس از انجماد و تکامل بهتر از پیامدهای آن به شمار می‌آید (۱۱).

در تحقیق حاضر مقایسه میزان زنده ماندن تخمک‌ها و جنین‌هایی که با غلظت ۷/۵ درصد ضدیخ به تعادل رسیدند با آنهایی که با غلظت ۳/۷۵ درصد به تعادل رسیدند، تأکیدی بر نقش حیاتی مرحله به تعادل رساندن سلول است. در این مرحله غلظت ضدیخ، طول زمان و دمای در معرض بودن سلول با ضدیخ حائز اهمیت است. هر مداخله‌ای که در وضعیت متعادل فیزیولوژیک سلول تغییری حتی ناپایدار و گذرا ایجاد کند، بالقوه می‌تواند برای سلول سمی باشد. تکنیک تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم که به عنوان تنها

تکنیک غلبه کننده بر عدم باروری ناشی از سخت شدن پرده شفاف پس از انجماد، معرفی می‌شود نیز، یکی از انواع این مداخلات محسوب می‌شود (۱)، چرا که در روند انجام تکنیک علاوه بر استرس مکانیکی مقدار کمی از اسپرم‌ها وارد تخمک می‌شود (۱۴). این موضوع می‌تواند دلیلی بر این یافته باشد که در گروه آزمون ۴ هیچ‌کدام از تخمک‌های زنده مانده پس از انجماد بارور نشدند. یافته‌های مطالعه حاضر این موضوع را تصدیق می‌کنند که جنین‌هایی که با محلول‌های انجمادی ۷/۵ درصد منجمد شدند، افزون بر آسیب‌های زود تأثیر ناشی از انجماد که قبلاً شرح آن رفت، به استناد نتیجه تحقیقات توکر و لیبرمن<sup>(۱)</sup> (۲۰۰۷) آسیب‌هایی با تأثیرات بلند مدت نیز خواهند دید. گرچه هسته سلول پس از انجماد توان بازسازی مورفولوژیک خود را دارد، اما کیفیت تکامل بعدی جنین‌های منجمد شده در حد ایده‌آل نیست (۱۲). به جز نتایجی که به وسیله شرودر و همکاران<sup>(۲)</sup> (۱۹۹۰) منتشر شد، مبنی بر این که با موفقیت تخمک موش با روش انجماد آهسته و استفاده از ۱۰ درصد غلظت دی‌متیل سولفوگساید منجمد شده است (۲۸)، به نظر می‌آید در این پژوهش برای اولین بار با استفاده از کرایوتاپ محلول ۷/۵ و ۱۰ درصد به اضافه نیم مول سوکرز برای انجماد شیشه‌ای تخمک‌های متافاز II اقدام شده است.

1-Tucker & Libermann  
2-Schroeder et al



می‌تواند به پیشرفت‌هایی در ذخیره‌سازی انجمادی تخمک و جنین منجر شود.

### نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که انجماد شیشه‌ای با استفاده از ظرف انجمادی کرایوتاپ به دلیل حداقل بودن حجم نمونه، سرد کردن و گرم کردن سریع را امکان‌پذیر می‌کند، به نحوی که با این وسیله، کاهش غلظت ضدیخ (دی متیل سولفوکساید و اتیلن گلیکول) که بیانگر افزایش میزان اطمینان از ذخیره‌سازی انجمادی است، تا ۱۲/۵ درصد برای انجماد شیشه‌ای تخمک و تا ۱۰ درصد برای انجماد شیشه‌ای جنین به جای ۱۵ درصد، قابل دسترسی است و می‌تواند گامی در جهت بهینه کردن پروتکل متداول به شمار آید.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب به وسیله وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی بود.

یافته‌های حاصل از ارزیابی قدرت تکامل این تصور را ایجاد کرده است که توان زیستی تخمک‌هایی که با ۱۰ درصد و جنین‌هایی که با ۷/۵ درصد غلظت ضدیخ انجماد شیشه‌ای می‌شوند کاهش پیدا می‌کند، اما الزاماً به حدی نیست که توان بارور شدن در تخمک یا تکامل بیشتر در جنین را از بین ببرد. بر این اساس می‌توان پیشنهاد کرد که محلول حاضر با غلظت کمتر از معمول را با برخی ترکیبات مثل؛ ثابت کننده‌های استکت سلولی، پلیمرهای حذف کننده یخ و غلظت زیاد قند مخلوط نموده و یا برخی ترکیبات مثل یون‌های سدیم و کلسیم را از محلول حذف کرد (۲۹-۳۴). بدین ترتیب و با توجه به تأثیرات زمان، دما و غلظت ضدیخ در مرحله تعادل، می‌توان محلول‌های ساخته شده را با مؤلفه‌های مختلف و در مراحل تکاملی مختلف تخمک و جنین آزمایش کرد (۲۱). با وجود تحقیقات مختلف درباره تأثیر سلول‌های کومولوس بر زنده ماندن تخمک‌ها پس از انجماد، ارزیابی کردن قابلیت پروتکل جدید در انجماد تخمک همراه با سلول‌های کومولوس مفید خواهد بود (۲۹ و ۳۵-۳۷). علاوه بر این به دلیل استرس‌های مکانیکی که طی تکنیک تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به تخمک وارد می‌شود، پیشنهاد می‌شود که سنجیدن کیفیت تخمک‌های منجمد شده با فعالیت پارتنوریز انجام شود، چرا که روشی کم استرس تر از روش تزریق اسپرم است. این موارد به نوبه خود

## REFERENCES:

1. Elder K, Dale B. In vitro fertilization. Second edition. United Kingdom: Cambridge university press; 2003; 45.
2. Ozmen B, Schultze-Mosgau A, Schopper B, Griesinger G, Diedrich K, Al-Hasani S. Ongoing pregnancy after revitrification of cleavage stage embryo. *MEFSJ* 2006; 11: 222-6.
3. Mandelbaum J, Anastasiou O, Levy R, Guerin JF, Larouziere V, Antoine JM. Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *Obstet Gynecol* 2004; 113S: S17-S23.
4. Tucker M, Morton P, Liebermann J. Human oocyte cryopreservation: a valid alternative to embryo cryopreservation?. *Obstet Gynecol* 2004; 113S: S24-S27.
5. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67:73-80.
6. Hredzak R, Ostro A, Maracek I, Kacmarik J, Zdilova V, Vesela J. Influence of Slow-rate Freezing and Vitrification on Mouse Embryos. *Acta vet Brno* 2005; 74:23-7.
7. Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* 2008; 57:137-41.
8. Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *The Veterinary Journal* 2009; 179: 287-91.
9. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod* 2009; 1:1-8.
10. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod* 2009; 1:1-8.
11. Dhali A, Anchamparuthy VM, Butler SP, Pearson RE, Mullarky IK, Gwazdauskas FC. Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in in vitro cultured mouse embryos. *Theriogenology* 2009; 71: 1408-16.
12. Tucker MJ, Liebermann J. Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. First edition. United kingdom: Informa healthcare; 2007; 240-6.
13. Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology* 2003; 46:121-34.
14. Eroglu A, Bailey SE, Toner M, Toth TL. Successful Cryopreservation of Mouse Oocytes by Using Low Concentrations of Trehalose and Dimethylsulfoxide. *Biol Reprod* 2009; 80:70-8.
15. Kyono K, Nakajo Y, Kumagai S, Nishinaka C. Vitrifying and warming of oocytes using cryotop. In: Tucker MJ, Liebermann J. Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. United kingdom: Informa healthcare; 2007;153-61.
16. Soleimani R, Van der Elst J, Heytens E, Van den Broecke R, Gerris J, Dhont M, et al. Back muscle as a promising site for ovarian tissue transplantation, an animal model. *Hum Reprod* 2008; 23: 619-26.
17. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod* 2002; 17: 1239-43.
18. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocyte using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16: 2350-6.
19. Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, et al. Correlation of abnormal mitochondria distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210:137-44.
20. Katkov II, Isachenko V, Isachenko E. Vitrifying in small quenched volumes with a minimal amount of, or without vitrificants: basic biophysics and thermodynamics. In: Tucker MJ, Liebermann J(editors). Vitrification in assisted reproduction: A user's manual and trouble shooting guide. United kingdom: Informa healthcare; 2007: 21-32.
21. Chen SU, Lien YR, Chao KH, HO HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *MCE* 2003; 202: 101-7.
22. Arav A, Yavin S. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 2007; 67: 81-9.
23. Gardner DK, Sheehan CB, Rienzi L, Katz-jaffe M, Larman MG. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 2007; 67:64-72.

24. Amir A, Zvi R. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes?. MCE 2008; 282:150-2.
25. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9:152-163.
26. Zenzes MT, Bielecki R, casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0°C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. Fertil Stril 2001; 75: 769-77.
27. Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T, Willadson SM. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. Cryobiology 2002; 44: 5-13.
28. Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. J Reprod Fertil 1990; 89: 43-50.
29. Zhang J, Nedambale TL, Yang M, Li J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. Ani Reprod Sci 2009; 110: 46-55.
30. Wang HY, Lu SS, Lun ZR. Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propanediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol. Cryobiology 2009; 58:115-7.
31. Eroglu A, Toner M, Toth TL. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. Fertil Stril 2002; 77:152-8.
32. Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. Reprod Biomed Online 2004; 9:152-63.
33. Stachecki JJ, Cohen J, Willadson SM. Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: The effect of replacing sodium with choline in the freezing medium. Cryobiology 1998; 37:346-54.
34. Larman MK, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. Reproduction 2006; 131: 53-61.
35. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. J Reprod Dev 2004; 50: 685-96.
36. VandeVoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. Ferti Stril 2008; 90: 805-16.
37. Rupert-Lingham CJ, Paynter SJ, Godfrey J, Fuller BJ, Shaw RW. Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: Loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing. Hum Reprod 2003; 18: 392-8.

# Survival, Fertilization and Developmental Rates of Cryotop-Vitrified Oocyte and Embryo Using Low Concentrated Cryoprotectants

Roozbehi A<sup>1</sup>, Shahrivar T<sup>2</sup>, Heidarian A<sup>3</sup>, Almasi-turk S<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Cellular & Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, <sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, <sup>3</sup>Student Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, <sup>4</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Boushehr University of Medical Sciences, Boushehr, Iran

Received: 19 Nov 2011      Accepted: 05 Apr 2012

## Abstract

**Background & Aim:** The preserving embryos, the risk of multiple pregnancies, the existence of factors in stimulated uterine cycle, are important forces in perfecting embryo cryopreservation. The aim of current study was to assess Survival, Fertilization and Developmental Rates (SRs, FRs, DRs) of the mouse oocytes and embryos using cryotop and low concentrated cryoprotectants solutions.

**Methods:** Mouse C57BL/6 oocytes and embryos were collected. Oocytes SRs, FRs, DRs were recorded after cryotop-vitrification/ warming. As well as comparing fresh oocytes and embryos, the data obtained from experimental groups (exp.) applying 1.25, 1.0, and 0.75 Molar (M) CPAs were analyzed in comparison to those of exp. adopting 1.5 M CPAs (largely-used concentration of EthyleneGlycol (EG) and Dimethylsulphoxide (DMSO)).

**Results:** The data of oocytes exposed to 1.25 M CPAs were in consistency with those exposed to 1.5 M and control group in terms of SR, FR and DR. As fewer concentrations were applied, the more decreased SRs, FRs and DRs were obtained from other experimental groups. The results of embryos were exposed to 1.25 M and 1.0 M was close to those vitrified with 1.5 M and fresh embryos. The results of 0.75 M concentrated CPAs solutions were significantly lower than those of control, 1.5 M and 1.0 M treated groups.

**Conclusion:** CPAs limited reduction to 1.25 M and 1.0 M instead of using 1.5 M, for oocyte and embryo cryotop-vitrification procedure may be a slight adjustment.

**Key words:** Cryotop, Embryo, Freezing, Oocyte, Vitrification

---

\*Corresponding Author: Almasi-turk S, Department of Anatomy., Faculty of Medicine, Boushehr University of Medical Sciences, Boushehr, Iran  
Email: s.alamsi@bpums.ac.ir